

台灣鳳梨介殼蟲萎凋-相關病毒-1之初步鑑定¹

廖吉彥² 胡仲祺³ 張清安² 鄧汀欽^{2,4}

摘 要

廖吉彥、胡仲祺、張清安、鄧汀欽。2008。台灣鳳梨介殼蟲萎凋-相關病毒-1 之初步鑑定。台灣農業研究 57:1-14。

從彰化縣社頭及二水等地鳳梨 [*Ananas comosus* (L.) Merr.] 栽種區採集罹患萎凋病的台農 2 號鳳梨植株 (代號: Pa1) 及果實, 經電子顯微鏡觀察、電泳分析、病毒鞘蛋白核酸與胺基酸序列比較、鞘蛋白基因之表現蛋白製作抗血清及其西方轉漬反應, 證實在鳳梨萎凋病的病株中有屬於鳳梨介殼蟲萎凋-相關病毒-1 (*Pineapple mealybug wilt-associated virus-1*, PMWaV-1)。而其果實上分離到的介殼蟲經鑑定為鳳梨嬌粉介殼蟲 [*Dysmicoccus brevipes* (Cockerell)]。利用電子顯微鏡以陰染法觀察, 病毒顆粒為長絲狀, 大小約 1250-1300 × 12-15 nm。從病毒 RNA 3' 端解序 783 個核苷酸屬於鞘蛋白基因, 與 GenBank 中的 PMWaV-1 (Access No. AF414119) 比較鞘蛋白基因之核苷酸, 其相同度達 99.1%, 而其胺基酸相似度則為 98.4%。將病毒鞘蛋白基因以限制酶切割後, 再以 DNA ligation kit 粘接至 pET28b (+) 載體, 轉殖於 DH5 α 菌株, 並於 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 菌株表現蛋白, 經電泳分析該表現蛋白之分子量約為 27 kDa。經注射白兔製備抗血清, 以西方轉漬反應顯示自製的抗體與病毒鞘蛋白基因表現蛋白及侵染 Pa1 植株的病毒鞘蛋白有同源 (homologous) 反應。因此利用病毒鞘蛋白基因之表現蛋白所製備的抗體即可作檢測之用, 本報告為台灣地區鳳梨萎凋病的病原 PMWaV-1 之鑑定首篇紀錄。

關鍵詞：鳳梨介殼蟲萎凋-相關病毒-1、鞘蛋白基因、表現蛋白、序列比對。

前 言

鳳梨為鳳梨科 (Bromeliaceae) 鳳梨屬 (*Ananas*) 的多年生草本植物, 原產於熱帶美洲。1972 年全台灣種植面積為 16,094 ha, 總產量 334,384 t, 其中 80% 供應外銷, 當時外銷量為世界前二位,

-
1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2308 號。接受日期: 96 年 12 月 26 日。
 2. 本所植病組助理研究員、研究員兼組長、研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
 3. 國立中興大學生物科技所 助理教授。台灣 台中市。
 4. 通訊作者, 電子郵件: tcde@wufeng.tari.gov; 傳真機: (04)23338162。

對農村經濟之發展與國家外匯收入貢獻良多。爾後由於農村人力缺乏，工資物價高漲，種植面積逐年減少。至 2000 年種植面積約為 9,546 ha。未來鳳梨產業朝向鮮食品種發展，提昇栽培技術，積極有效管理病蟲害，生產高品質果實，以提高鳳梨產業的競爭力 (Chang 1991)。

鳳梨萎凋病 (Mealybug wilt of pineapple, MWP) 的發生早在 1950 年陶氏 (Sun *et al.* 1953; Tao 1989) 發表鳳梨萎凋病病因及其防治方法指出鳳梨萎凋病與粉介殼蟲有關，其後孫、李 (Sun *et al.* 1953) 等人調查鳳梨萎凋病與螞蟻及粉介殼蟲對萎凋病的影響，在報告中也指出螞蟻及粉介殼蟲共生現象會導致鳳梨萎凋病的發生，進而發現在鳳梨田外種植保護行並噴施防螞蟻藥劑阻隔螞蟻，可間接阻止鳳梨粉介殼蟲進入，藉以預防鳳梨萎凋病 (Sun *et al.* 1953)。但始終無鳳梨萎凋病病原的相關記載。直到 1988 年 Rohrbach 指出感染萎凋病的鳳梨上發現有病毒的 RNA 存在，經初步分離鑑定，發現該病毒屬於長絲狀的 closterovirus group (Rohrbach *et al.* 1988; Borroto *et al.* 1998)。國外相關報告指出，鳳梨萎凋病的病原包括有 *Pineapple mealybug wilt associated virus-1* (PMWaV-1)、*Pineapple mealybug wilt associated virus-2* (PMWaV-2) 及 *Pineapple mealybug wilt associated virus-3* (PMWaV-3) 等 (Perez *et al.* 2006)，而其中三者的比較是以 RNA-dependent RNA polymerase、small hydrophobic protein 及 HSP-70 蛋白胺基酸序列相似性為主，PMWaV-3 與 PMWaV-1 之相似性分別為 64%、73%、及 79%，而 PMWaV-3 與 PMWaV-2 之相似性分別為 30、13%及 44%，顯示 PMWaV-3 與 PMWaV-1 關係較相近 (Perez *et al.* 2006)。本土鳳梨萎凋病的病原學研究先前並無相關的報告 (Lin 2001)，因此有必要進一步瞭解探討。

材料與方法

病毒之來源

從彰化縣社頭鄉及二水鄉鳳梨栽種區採集疑似罹患萎凋病的台農 2 號鳳梨植株 (Pa1)，其果實有粉介殼蟲寄生，因粉介殼蟲會分泌蜜露，因此疑似病毒感染的植株有煤煙病的發生。將病株取回後，放入白色養蟲網繼續觀察及以鳳梨果實飼養粉介殼蟲，以供試驗用。另一方面，以白色養蟲網種植健康鳳梨株，以供對照。

電子顯微鏡觀察

以陰染法進行電子顯微鏡觀察病毒顆粒之形態，切取 Pa1 病株葉組織，壓取粗汁液以等量 2% 磷鎢酸 (Phosphotungstic acid; PTA) 行陰染後 (Christie *et al.* 1968; Hall 1964)，以 Hitach 7000 電子顯微鏡進行觀察。之後，進行免疫電子顯微鏡觀察時，則依照 Milne (Milne *et al.* 1977) 所述之程序，先以免疫球蛋白 IgG 覆膜處理 (coating) 於銅網 (grid) 上，再與罹病粗汁液反應吸附病毒，進一步以免疫球蛋白 IgG 覆蓋處理後，以前述方法陰染後再行鏡檢。

病毒純化

將 Pa1 病株之葉片 250 g，置-20℃冷凍隔夜，用液態氮處理後，以粉碎機打碎成粉狀，加入 500 mL 的 500 mM EB buffer (內含 Tris-HCL buffer pH 8.4, 4% Triton-X 100 及 0.2% 2-Mercapto-ethanol) (Wakman *et al.* 1995) 攪拌。再於 4℃下攪拌 1 hr 後，用紗布過濾，經 43,300 g (Hitachi CR20B2,R12A3) 離心 20 mins，取上澄液，經 367,200 g (Hitachi SCP70G, RP70T) 離心 35 mins 沉降濃縮病毒，再以 44 mL 的 100 mM TM buffer (內含 Tris-HCL buffer pH 8.5, 10 mM MgCl₂) 懸浮沉澱物成為初步純化

試料。進一步純化則利用等密度平衡離心法，將試料在 4°C 下分裝至離心管中，以 50% Cs₂SO₄ 中經 255046 g (Hitachi SCP70, RP65T) 離心 23 hrs 後，可在距離心管口 5.2 cm 處形成一蛋白光帶 (Hu *et al.* 1996)。純化後試液用電子顯微鏡以陰染法觀察。

核酸分析

反轉錄-聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)：分別取 140 µg 之 Pa1 植株病葉與正常健康株，利用全量 RNA 純化試劑組 (Viogene plant total RNA extraction miniprep system)，進行全量 RNA 之抽取純化。根據 Melzer 2001 及 NCBI 已註冊的核酸序列 (Accession No. AF414119 及 Accession No. AF283103) 設計出專一性引子對，pa119-f (5'-AGCTCATAGATTCAGGACCG-3') 及 pa119-r (5'-ACCTTATTTGCGTCCACCC-3') 係針對 PMWaV-1 病毒。而 pa103-f (5'-CGTTACCAGTAGCTTTAGTTCC-3') 及 pa103-r (5'-TCCTACCCTGAAACAGCTCC-3') 係針對 PMWaV-2 病毒。利用反轉錄試劑組 [Pro Tech., Hot Start RT-PCR kit，內含 AMV reverse transcriptase (25U)，Taq DNA Polymerase (2U)，RNasin (5U)，dNTPs (1 mM)，Antibody (2U)] 進行 RT-PCR 反應，於每一 20 µL 反應中加入 1 µL RNA template、17 µL sterile H₂O、1 µL pa119-f (20 mM) 及 1 µL pa119-r (20 mM)，於熱循環反應儀 (Biometra Uno-thermoblock, Biometra biomedizinische Analytik GmbH) 進行反應。反應程序為 RNA 在 58°C 變性 5 mins，42°C 下 1 hr 合成 cDNA 之後進行 35 個 PCR 循環反應，94°C 下變性 1 min，54°C 下煉合 1 min，72°C 下聚合 1.3 min，最後一個循環中 72°C 下聚合延長 8 mins，反應結果以電泳進行分析。

核酸片段選殖和序列分析：經上述 RT-PCR 增幅所得之 DNA 片段，以 TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen Carlsbad, CA) 進行選殖，經由轉形作用送入 *Escherichia coli* DH5α 宿主，利用藍白菌落反應初步選出可能含有嵌入序列之菌株，後經微量質體純化分析，以進一步選出確定之轉型菌株。再以 ABI PRISM 377-96 DNA 序列分析儀 (Perkin-Elmer, CA, USA) 及其配用之螢光標識反應試劑組 (ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit) 進行核苷酸序列分析，將此所得序列利用 GCG Wisconsin Package 及 DNA STAR 軟體與 GenBank 上已正式登錄之核苷酸序列進行分析比對。

表現 CP gene 蛋白：依據經上述 CP gene 經定序後，序列稍加修改設計出專一性引子對 pa-exp-f: (5'-TTT TGT c ca tgg CTG ATT G-3') 及 pa-exp-r: (5'-GTG CTG gaa ttc GCC CTAA-3')，分別含有 *NcoI* (c/catgg) 及 *EcoI* (g/aattc) 限制酶切位。以代號：5、8 及 15 轉殖株之質體 DNA 為模版，以 pa-exp-f 及 pa-exp-r 進行 PCR，獲得一約 0.9 K bp 之產物包含 cp gene 及限制酶切位，將上述核酸產物與 pET28b (+) 載體以限制酶素切割，再以 Novagen DNA ligation kit 粘接後，轉殖於 DH5α 菌株，並於 BL21 (DE3) pLySs 菌株表現蛋白，共獲得 3 個 BL21 (DE3) 轉殖株代號：5、8 及 15，其內 pET28b (+) 載體確實含有 CP gene 序列；分別將這 3 個 BL21 (DE3) 轉殖株加入 5 mL LB 培養基培養過夜，取 O.D₆₀₀ 達到 0.6 之菌液加至 500 mL M9 培養基 (含 0.05 ppm 之 kanamycin 及 34 ppm 之 chloramphenicol) 中，於 37°C 培養約 3.5 hrs，加入濃度 100 ppm IPTG 誘導蛋白之表現，IPTG 的最終濃度為 0.2 mM，再以 200 ppm rifampicin 培養 4 hrs 以抑制非專一性蛋白之表現，表現外鞘蛋白經 SDS-PAGE 電泳分析後，以確定其位置 (Chen *et al.* 2002)。

CP gene 表現蛋白經家兔免疫注射製備血清

以紫外光吸收光譜分析決定純化表現鞘蛋白之純度及濃度後 (Dijkstra *et al.* 1998; Cseke *et al.* 2004)，定量 (1 mg/mL) 分裝並加以冷凍保存以供後續試驗。在進行表現蛋白抗體之製備過程中，乃將此純化表現蛋白試料 1 mg/mL 加等量之完全補助劑充分乳化，於家兔後腿行肌肉注射，以後每隔七天並以不完全補助劑乳化等量純化表現蛋白試料追加注射，總共追加注射三次。最後一次注射後第七天起每七天家兔耳部行靜脈採血，所採集之抗血清，分裝後置於-75°C 下冷凍保存。

西方轉漬分析以測試抗體專一性

由代號為 5 的 BL21 (DE3) 轉殖株所表現的病毒 CP gene 表現蛋白與 Pa1 植株組織液經含有 1% SDS 的 12% polyacrylamide 電泳分離後，以 0.025% Coomassie blue R250 (CBR250) 染色後觀察蛋白帶數目及移動距離，據以計算病毒鞘蛋白之分子量之大小。另於轉漬槽內，以 100 V 通電 1.5 hr 將電泳膠轉漬於硝化纖維膜上，再與病毒 CP gene 表現蛋白之抗體 (稀釋 500 倍) 反應，然後以鹼性磷酸酵素標定之山羊抗兔免疫球蛋白 (Sigma A8233) (稀釋 1000 倍) 反應，最後以 nitroblue tetrazolium (NBT) 及 bromochloroindoyl phosphate (BCIP) 基質進行呈色 (Gooderham 1984)。

結 果

病毒之來源

疑似罹患萎凋病的台農 2 號鳳梨植株 (Pa1)，其中 Pa1 病株葉部呈現黃化、葉尖枯萎、及葉片變紅等病徵 (圖 1A)，感染初期葉片呈現綠色斑點突起 (圖 1C)，其果實上介殼蟲經鑑定為鳳梨蚜粉介殼蟲 [*Dysmicoccus brevipes* (Cockerell)]，其分泌蜜露吸引共棲的螞蟻而導致煤煙病的發生 (圖 2)。在白色養蟲網種植健康鳳梨株，經種植一個月觀察，初期葉片並未有綠色斑點突起。而 Pa1 病株初期葉片一直呈現綠色斑點突起。

電子顯微鏡觀察

切取 Pa1 病株之組織汁液經 2% PTA 陰染，所觀察到組織內的長絲狀病毒顆粒大小約 1250-1300 × 12-15 nm (圖 3)。病毒顆粒經外鞘表現蛋白抗體反應吸附後，在電子顯微鏡下觀察，發現病毒顆粒周圍有被修飾 (decoration) 的現象 (未登出)。

病毒純化

由 Pa1 病株中純化所得試液約 4.5 mL，其 A260、A280 及 A260/A280 比值分別為 0.715、0.479 及 1.492。經電子顯微鏡觀察，未發現病毒顆粒。重複純化三次，皆得到相類似的結果。因此，所獲得的試液，無法用來製備專一性血清。

核酸分析

反轉錄-聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)：以 pa119-f 及 pa119-r 為專一引子對，以自 Pa1 植株病葉為材料的病毒 RNA 為模版，預估可於 RT-PCR 後獲得一約 1.1 Kbp 之 DNA 產物，瓊脂電泳分析結果發現，可獲得一與預估值相符之 DNA 片段 (圖 4)。而以 pa103-f 及 pa103-r 為專一引子對，進行類似實驗後未能獲得任何 DNA 產物。以正常健康株為材料時，不論以 pa119-f 及 pa119-r 或 pa103-f 及 pa103-r 為引子對皆未能獲得有任何 DNA 產物。



圖 1. 鳳梨萎凋病株 (Pa1) 所呈現之病徵。(A) 罹病株黃化、葉片變紅；(B) 健康株；(C) 初期病徵呈現綠斑、葉尖枯萎（箭頭所指）。

Fig. 1. Symptoms of plants of *Ananas comosus* (Pa1) associated with pineapple wilt: (A) Diseased plant showing yellowing, reddening, and dieback, (B) The healthy plant, (C) The green bumps (as indicated by the arrow) developed at early stage of infection.

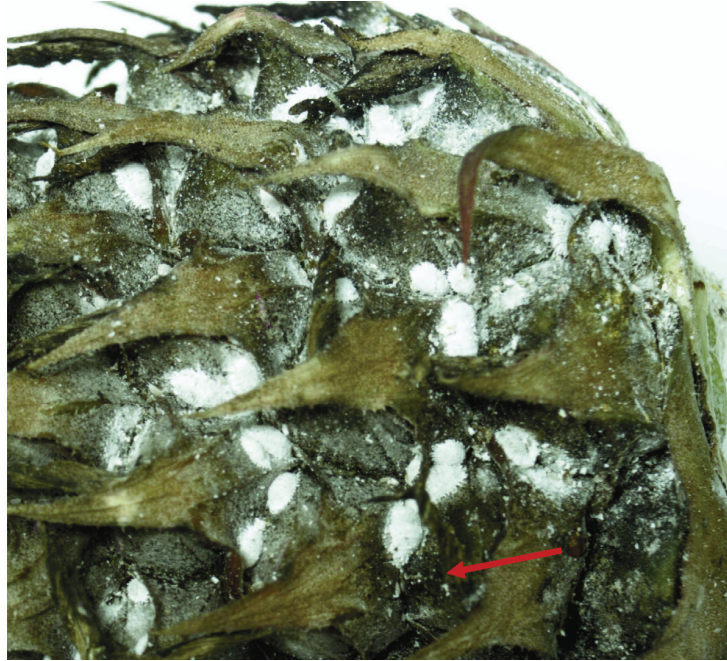


圖 2. 鳳梨果實被鳳梨摘粉介殼蟲危害，並有煤煙病的發生 (如箭頭)。

Fig. 2. Fruit of *Ananas comosus* infested by *Dysmicoccus brevipes* and on which sooty mold occurred (indicated by arrows).

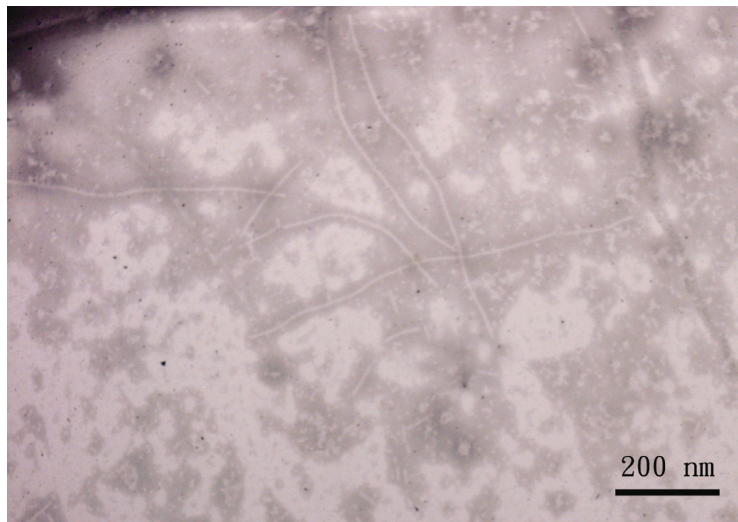


圖 3. 鳳梨萎凋病株 (Pa1) 葉組織粗汁液中的病毒顆粒。

Fig. 3. Virions in leaf crude sap of diseased plant (Pa1).

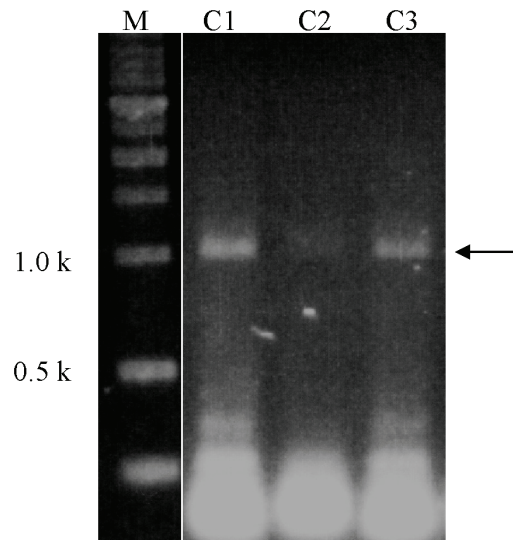


圖 4. 鳳梨萎凋病株 (Pa1) 以引子對 pa119-f 及 pa119-r 進行病毒鞘蛋白基因反轉錄聚合酶鏈鎖反應；PCR 擴增產物以瓊脂電泳進行分析。箭頭：擴增產物。C1、C2 及 C3：分別採用不同部位的葉片組織。

Fig. 4. Agarose gel electrophoresis analysis of CP gene of virus isolate from diseased plant (Pa1) amplified by RT-PCR using primers pa119-f and pa119-r. (Lane M is molecular size marker. Lanes C1, C2 and C3 are RT-PCR products from three different infected leaf tissues. The expected RT-PCR product of CP gene of virus, about 1.1 Kbp, is indicated by the arrow on the right.)

核酸片段選殖和核酸序列分析：利用藍白菌落反應初步選出可能含有嵌入序列之選殖菌株，由微量質體純化，經洋菜膠體電泳分析，進一步選出確定之轉型菌株，選出可能含有嵌入序列之選殖菌株 3 個命名為 5、8 及 15，從進行核酸序列分析結果顯示與 GenBank 上已正式登錄的核苷酸序列進行相同性比對，得知與 *Pineapple mealybug wilt-associated virus-1* (PMWaV-1) (Accession No. AF414119 complete cds) 的 CP gene 之核苷酸相同度 (identity) 高達 99.1% (圖 5)，其胺基酸相似度 (similarity) 為 98.8% (圖 6)，但與其他鳳梨萎凋病毒病原相異。

表現 CP gene 蛋白：收集 CP gene 的表現蛋白進行 SDS-PAGE 電泳分析。結果 5、8 及 15 等三個轉殖株比對照 pET28b (+) 多出一個約為 27 kDa 之條帶 (圖 7)，即為表現 CP gene 蛋白。

CP gene 表現蛋白經家兔免疫注射製備血清

將上述細菌表達之病毒 CP gene 表現蛋白以注射家兔方式，產生專一性抗血清。並將所獲得之抗血清 (共約 30 mL)，分別以 1 mL 為單位裝瓶並在 -20°C 下保存，以供日後使用。

西方轉漬分析以測試抗體專一性

將轉殖株所生產的病毒 CP gene 表現蛋白與 Pa1 植株組織液經含有 1% SDS 的 12% polyacrylamide 電泳分離後，其病毒鞘蛋白分子量與病毒 CP gene 表現蛋白皆約為 27 kDa (圖 8A)，且在轉漬於硝化纖維膜後，與前述以表現蛋白所製備之抗體反應，在 27 kDa 處產生紫色之反應帶 (圖 8B)。

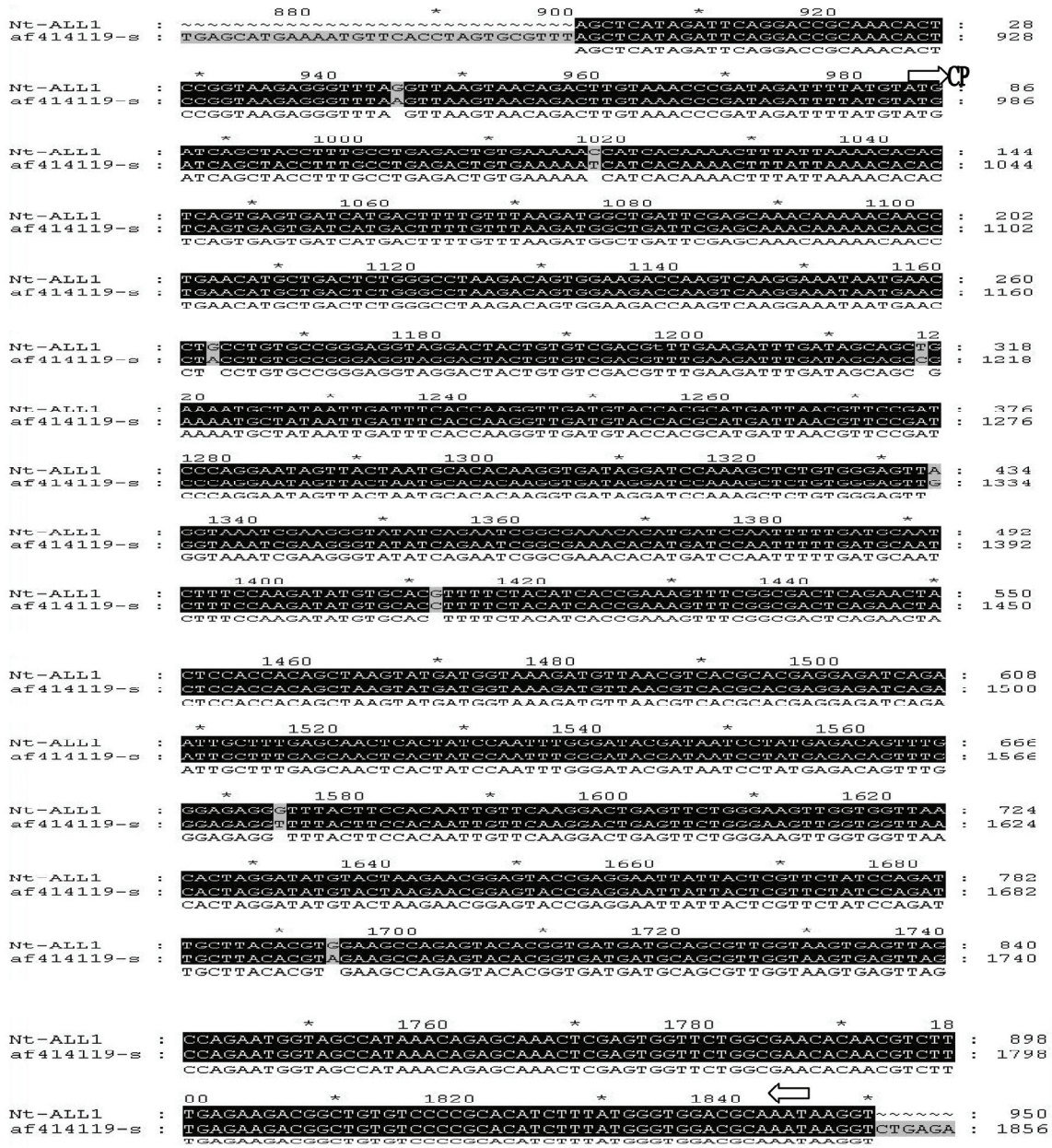


圖 5. 鳳梨萎凋病株 (Pa1) 上病毒 CP gene (NT-ALL1) 與 PMWaV-1 (af414119) 鞘蛋白基因核苷酸序列之併列分析。

Fig. 5. Alignment of CP gene (NT-ALL1) nucleotide sequence of virus on infected plant (Pa1) with *Pineapple mealybug wilt-associated virus-1* (af414119). (The CP open reading frame is indicated by the white arrows. The consensus sequence was shown on bottom.)

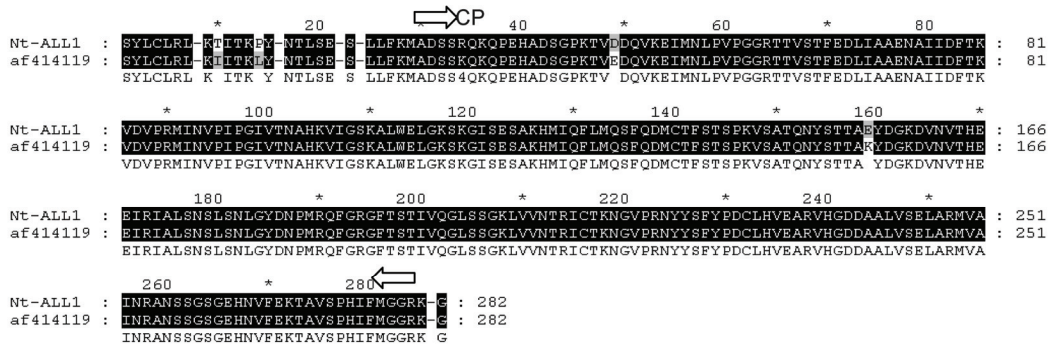


圖 6. 鳳梨萎凋病株 (Pa1) 上病毒 CP gene (NT-ALL1) 與 PMWaV-1 (af414119) 鞘蛋白胺基酸序列之併列序列分析。

Fig. 6. Alignment of CP gene (NT-ALL1) amino acid sequence of virus on infected plant (Pa1) with *Pineapple mealybug wilt-associated virus-1* (af414119). (The CP region is indicated by the white arrows. The consensus sequence was shown on bottom.)

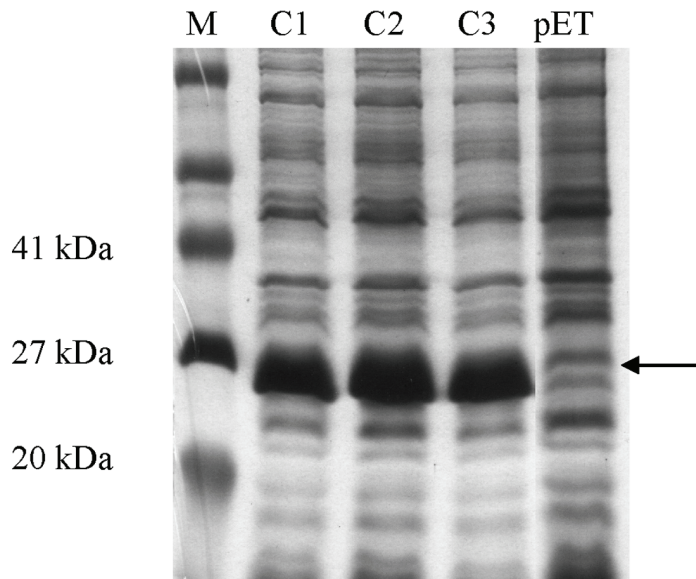


圖 7. 應用 SDS-PAGE 分析鳳梨萎凋病株 (Pa1) 上病毒 CP gene 之表現蛋白。M：分子量標示蛋白；C1、C2 及 C3：自三個不同轉殖株表現蛋白。pET: pET28b (+) 載體箭頭所指即重組病毒鞘蛋白所在位置。

Fig. 7 Analyses of expressed protein of CP gene of virus on infected plant (Pa1) by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. (Line M is standard markers for molecular weights, lines C1, C2 and C3 are expressed protein of CP gene of virus on infected plant (Pa1). Line pET is expressed protein of vector pET28 (+) without CP gene insertion. The arrow indicates the location of expressed protein subunit of CP gene.)

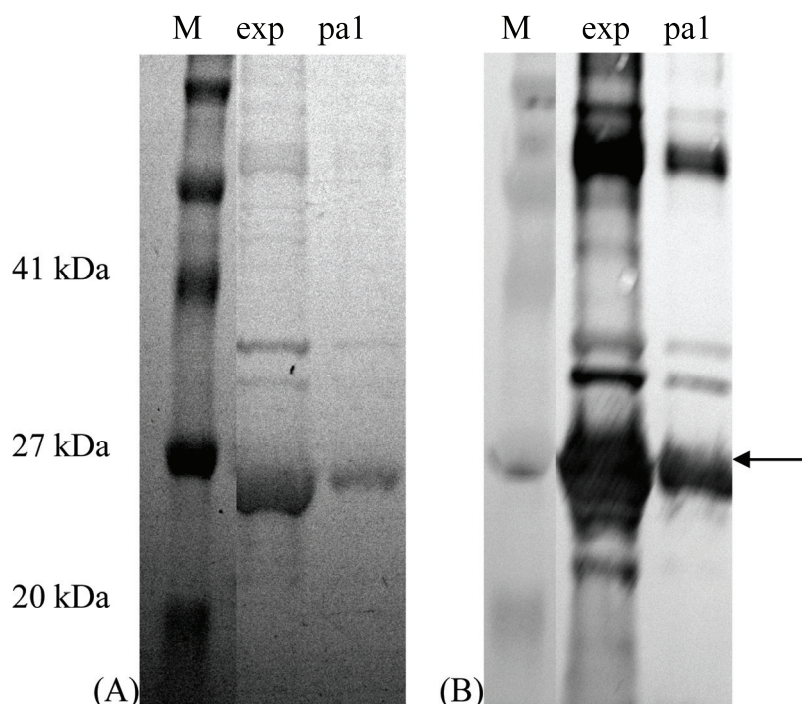


圖 8. 鳳梨萎凋病株 (Pa1) 上病毒 CP gene 表現蛋白抗體與鳳梨萎凋病株 (Pa1) 上病毒反應之專一性。(A) SDS-PAGE 電泳圖；(B) 西方轉漬分析。M：分子量標示蛋白；exp：CP gene 表現蛋白；pa1：病毒鞘蛋白。箭頭所指即表現蛋白所在位置。

Fig. 8. Specificity of antiserum against expressed protein of CP gene of virus on infected plant (Pa1) reacted with coat protein of virus on infected plant (Pa1) determined by Western blot. (Line M is standard markers for molecular weights, line exp is expressed protein of CP gene of virus on infected plant (Pa1) and pa1 is coat protein of virus on infected plant (Pa1). Part A is the result of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and B is Western blot. The arrow indicates the location of expressed protein subunit of cp gene.)

討 論

據先前研究指出粉介殼蟲引起的鳳梨萎凋病的病徵包括葉尖枯萎、葉片變紅及葉緣往下捲、幼葉及老葉呈現萎凋，其病徵發展與 *Pineapple mealybug wilt-associated virus-2* (PMWaV-2) 及鳳梨粉介殼蟲存在有關。因此，認為 PMWaV-2 及鳳梨粉介殼蟲是引起鳳梨萎凋病的二個因素 (Sether & Hu 2000)。若沒有鳳梨粉介殼蟲存在下，即使鳳梨被 PMWaV-1 及 PMWaV-2 複合感染也不會有萎凋病的病徵。反之，當鳳梨被 PMWaV-1 單獨感染並且有鳳梨粉介殼蟲存在下，萎凋病的病徵不會發展。只有在鳳梨被 PMWaV-2 感染並且有鳳梨粉介殼蟲存在下，萎凋病的病徵才會發展。文中更進一步指出典型鳳梨萎凋病的病徵是在當 PMWaV-2 被以 RT-PCR 方式檢測出後的 4-7 wks 內便會發生。如果沒有 PMWaV-2 存在下，即使被鳳梨粉介殼蟲危害超過 10 個月，鳳梨也不會有萎凋病

的病徵發生 (Sether & Hu 2002)。然而，在彰化縣發生萎凋病的鳳梨植株，吾等以 PMWaV-1 及 PMWaV-2 專一性引子對，利用 RT-PCR 方式去檢測，沒有發現 PMWaV-2 存在，但仍然有鳳梨嬌粉介殼蟲及螞蟻存在。其間的差異，可能性如以下：(1) 台灣沒有 PMWaV-2 病毒，並且萎凋病的病徵發生不需 PMWaV-2 病毒的協力；(2) 台灣 PMWaV-2 病毒的核酸序列與國外的差異大，導致 PMWaV-2 專一性引子與之無法配對；(3) 台灣鳳梨萎凋病病徵的發展需要 PMWaV-2 病毒的協力，但採樣時，植株體內 PMWaV-2 病毒量甚低；(4) 有其他不明物質或生物體，與 PMWaV-1 病毒協力，使得萎凋病的病徵發生不需 PMWaV-2 病毒的存在。(5) 台灣地區所栽植的鳳梨品種 (台農 2 號)、或是栽培方法與環境因子使其對於 PMWaV-1 的感病性較強而呈現病徵。總之，台灣地區鳳梨萎凋病是否需要 PMWaV-2 病毒的協力，仍需進一步探討。

PMWaV-1 在鳳梨病株的分佈主要是在維管束組織。因此，以病株組織當純化材料時，若組織絞碎不完全，篩管組織的病毒不易溶入緩衝液中。而鳳梨病株組織材料較健康組織部位質地堅韌，不易絞碎完全。所以較無法獲得高量的病毒濃度，如何有效提高純化病毒濃度，有待進一步探討。

台灣鳳梨萎凋病病原之 CP gene 序列與 2006 年 Melzer, M. J 在 GenBank 上登錄的核苷酸序列進行比對，得知與 *Pineapple mealybug wilt-associated virus-1* (PMWaV-1) (Access No. AF414119 complete cds) 的鞘蛋白基因之核苷酸相同度高達 99.1%，而其胺基酸相似度為 98.8%。由此可知，二者的親緣關係極接近，甚至可能出自同一個來源。

鳳梨通常利用裔芽、吸芽、較粗的塊莖芽、或老莖切塊等方式栽植，母株感染的病毒可經由無性繁殖傳入子代，造成子代幼苗就成為帶毒的植株 (Sether & Hu 2001)，影響日後植株生長及病勢的擴散，帶毒的吸芽等繁殖體傳更可在人為操作下極易到處傳播，在此情形下更突顯健康鳳梨繁殖體在病害管理方面的重要性。而本研究所製備之 PMWaV-1 專一性抗血清不但在病原學鑑定研究之用，尚可篩檢健康鳳梨繁殖體，不僅能防止病害的蔓延，又可增加植株的健康與產量。

誌 謝

本試驗承本所應動組陳助理研究員淑佩小姐及翁振宇先生在嬌粉介殼蟲種類的鑑定及林玫瑰小姐從旁協助，一併致上衷心謝忱。

引用文獻 (Literature Cited)

- Borroto, E. G., M. Cintra, J. Gonzalez, C. Borroto, and P. Oramas. 1998. First report of closterovirus-like particle associated with pineapple plants (*Ananas comosus* cv. Smooth Cayenne) affected with pineapple mealybug wilt in Cuba. *Plant Dis.* 82:263 (Note)
- Chang, C. C. 1991. The Taiwanese pineapple future development trend. p.373-377. *in: Fruit Production, Research and Research in Taiwan.* Agric. Res. Inst. Pub. Chia-Yi. (in Chinese with English abstract)
- Chen, C. C., T. Hsiang, F. L. Chiang, and C. A. Chang. 2002. Molecular characterization of *Tuberose mild mosaic virus* and preparation of its antiserum to the coat protein expressed in bacteria. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 43:13-20.

- Christie, S. R., J. R. Edwardson, and F. W. Zettler. 1968. Characterization and electron microscopy of a virus isolated from *Bidens* and *Lepidium*. *Plant Dis.* 52:763-768.
- Cseke, J. L., B. P. Kaufman, K. G. Podila, and C. J. Tsai. 2004. *In Vivo* Immunization of Mice with the Purified Antigen. p.114. *in: Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine.* 2nd ed. CRC Press. New York Washington, D. C. USA.
- Dijkstra, J. and C. P. de Jager. 1998. UV light absorption. p.277-284. *in: Practical Plant Virology: Protocols and Exercises.* Springer-Verlag Berlin. Heidelberg New York.
- Gooderham, K. 1984. Transfer techniques in protein blotting. p.165-178. *in: Methods in Molecular Biology Vol. 1.* (J. M. Walker, ed.) Humana Press. Clifton, New Jersey.
- Hall, C. E. 1964. Electron microscopy: principles and application to virus research. p.253-266. *in: Plant virology.* (Corbett, M. K. and H. D. Sisler, eds.) Univ. Florida Press. Gainesville.
- Hu, J. S., D. M. Sether, and D. E. Ullman. 1996. Detection of pineapple closterovirus in pineapple plants and mealybugs using monoclonal antibodies. *Plant Pathol.* 45:829-836.
- Lin, C. C. and S. F. Tsai. 2001. The review of the prevention of Taiwan pineapple disease and control method currently. p.31-36. *in the Proceeding of the Symposium on Taiwan Pineapple Species and the Disease Management.* Agric. Res. Inst. Pub. Fong Shan, Taiwan. (in Chinese with English abstract)
- Melzer, M. J., A. V. Karasev, D. M. Sether, and J. S. Hu. 2001. Nucleotide sequence, genome organization and phylogenetic analysis of pineapple mealybug wilt-associated virus-2. *J. Gen. Virol.* 82:1-7.
- Milne, R. G. and E. Luisoni. 1977. Rapid immune electron microscopy of virus preparations. *Method Virol* 6:265-281.
- Perez, E. P., D. M. Sether, M. J. Melzer, J. L. Busto, J. S. Hu, and C. Nagai. 2006. Characterization and control of pineapple mealybug wilt associated Ampeloviruses. *Acta Hort.* 702:23-27.
- Rohrbach, K. C., J. W. Beardsley, T. L. GermN, N. J. Reimer, and K. G. Sanford. 1988. Mealybug wilt, mealybug, and ants on pineapple. *Plant Dis.* 72:558-564.
- Sether, D. M. and J. S. Hu. 2000. A closterovirus and mealybug exposure are both necessary components for mealybug wilt of pineapple symptom induction. *Phytopathology* 90 (suppl.): S71. (Abstract)
- Sether, D. M. and J. S. Hu. 2001. The impact of pineapple mealybug wilt-associated virus-1 and reduced irrigation on pineapple yield. *Aust. Plant Pathol.* 30:31-36.
- Sether, D. M. and J. S. Hu. 2002. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. *Phytopathology* 92:928-935.
- Sun, S. K., H. S. Li, and H. S. Chien. 1953. The investigation report of pineapple wilt disease on central Taiwan. *Taiwan Agri. For.* 7(2):33-36.

Tao, C. C. 1989. Scales insects name list of Taiwan, Republic of China. Bull. Taichung DAIS 22:57-70.

Wakman, W., D. S. Teakle, J. E. Thomas, and R. G. Dietzgen. 1995. Presence of a clostero-like virus and a bacilliform virus in pineapple plants in Australia. Aust. J. Agric. Res. 46:947-958.

The Preliminary Identification of *Pineapple mealybug wilt-associated virus-1* on Pineapple in Taiwan¹

Jye-Yann Liao², Chung-Ci Hu³, Chin-An Chang², and Ting-Chin Deng^{2,4}

Abstract

Liao, J. Y., C. C. Hu, C. A. Chang, and T. C. Deng. 2008. The preliminary identification of *Pineapple mealybug wilt-associated virus-1* on pineapple in Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 57:1-14.

A naturally infected pineapple (*Ananas comosus*) sample (Pa1) was collected from major pineapple-growing area in Sheto and Ershui, Changhua County, Central Taiwan. The diseased plant showed typical symptoms of tip dieback, reddening and downward curling of leaf margins, and early stages of green bumps on leaves. The fruits of pineapple were infested with mealybug (*Dysmicoccus brevipes*) and sooty mold. By electron microscopic observation, immunosorbent electron microscopy, coat protein electrophoresis, Western blot analysis, and nucleotide sequencing, the virus was identified as an isolate of *Pineapple mealybug wilt-associated virus-1* (PMWaV-1). Electron microscopic observations of diseased tissues revealed the presence of flexuous-shaped virus particles, 1250-1300 × 12-15 nm in dimension. The virus consisting of coat protein subunit with an estimated molecular weight of 27 kDa was found. The 783 3'-terminal nucleotides of this virus were sequenced and compared with corresponding sequences of PMWaV-1 (Access No. AF414119) listed in public databases. We found that this virus is most closely related to the PMWaV-1 with nucleotide and amino acid sequence similarities of 99.1% and 98.4%, respectively. The coat protein (CP) gene was further cloned into the vector pET28b (+), then used to express proteins in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and to produce specific antiserum for future diagnostic purposes. In Western blot, the prepared antiserum reacted with the expressed protein of CP gene and PMWaV-1 antigens in infected pineapple plant. This is the first report of detection and identification of PMWaV-1 associated with infected *Ananas comosus* in Taiwan.

Key words: *Pineapple mealybug wilt-associated virus-1*, CP gene, Expressed protein, Sequence comparison.

-
1. Contribution No.2308 from Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. Accepted: December 26, 2007.
 2. Respectively, Assistant Researcher, Researcher and Head, Researcher, Plant Pathology Division, ARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
 3. Assistant Professor, Graduate Institute of Biotechnology National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan.
 4. Corresponding author, e-mail: tcde@wufeng.tari.gov.tw; Fax: (04)23338162.